

Laboratoř molekulární cytologie a cytometrie

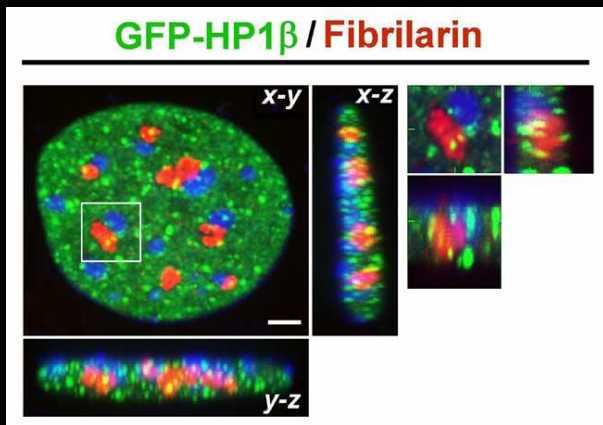
Kozubek S., Bártová E., Harničarová A., Galiová G., Legartová S., Kůrová J., Uhlířová R.

Biofyzikální ústav Akademie věd České republiky, v.v.i., Brno (www.ibp.cz)

E-mail: bartova@ibp.cz

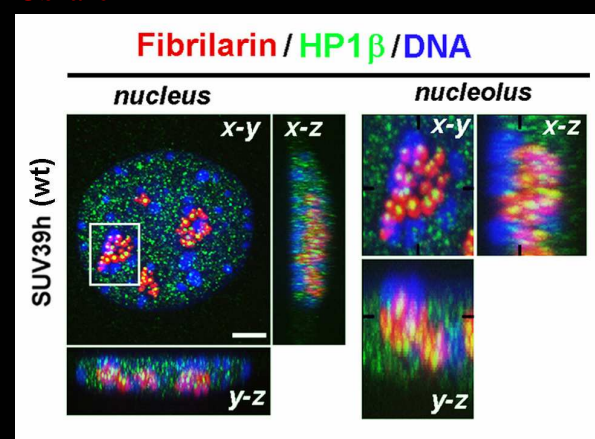
Laboratoř molekulární cytologie a cytometrie z Biofyzikálního ústavu Akademie věd České republiky má rozsáhlou zkušenost ve studiu 3D-jaderné architektury buněčných jader pomocí konfokální mikroskopie (Bártová et al., 2005, 2008; Harničarová et al., 2006; Kozubek M. et al., 1999; Kozubek S., 1997, 2000). Pro zobrazování jaderných struktur používáme fluorescenční techniky jako například imunofluorescence, DNA a RNA fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Vazbu proteinů na DNA a expresi genů studujeme pomocí chromatinová imunoprecipitace (ChIP-PCR, ChIP-on-chip) a RT-PCR. Náš výzkum směřuje mimo jiné ke studiu živých buněk na modelech reporterových buněčných linií. Tyto experimenty umožňují odhalit dynamiku jaderných proteinů in vivo. Zaujímáme se také o jaderné radiální distribuce genů, chromozómů a proteinů regulujících chromatin. Systém konfokální mikroskopie s vysokým rozlišením nám umožňuje zkoumat modifikace histonů, které představují základní stavební jednotky chromatinu. Změny v jaderném uspořádání genů a karyotypové změny dáváme do kontextu nádorové transformace buněk. Těmito experimenty bychom chtěli objasnit vzájemné vztahy mezi jadernou architekturou a jadernými/buněčnými procesy jako je transkripce, reparace DNA a buněčná diferenciaci. Přispíváme tak ke znalostem biologie chromatinu nádorových buněk a lidských embryonálních kmenových buněk.

Obrázek 1

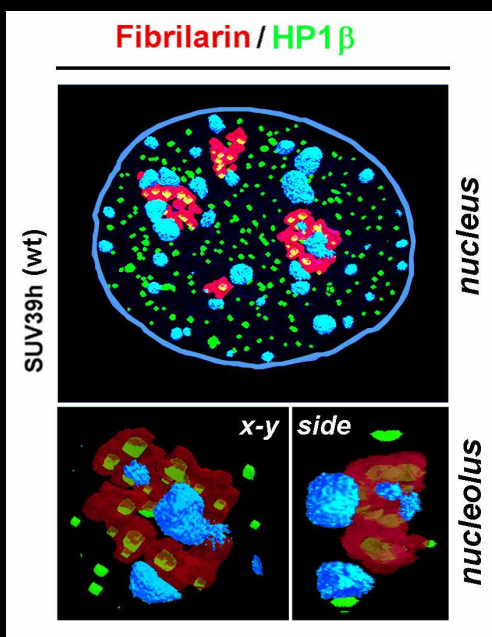


Pomocí konfokální mikroskopie a uvedených molekulárně-biologických technik studujeme změny v jádrech buněk normálních a nádorových. Konfokální mikroskopie s vysokým rozlišením nám umožňuje analyzovat různé struktury v buněčných jádrech. Zabýváme se například epigenetikou jaderek (značeno fibrilarinem), jejichž změna je důležitým markerem u nádorových buněk. Především změny v histonovém kódu jsou spojovány se nestandardní funkcí jaderek. HP1 proteiny, ukázané na obrázcích 1 a 2 zeleně, patří k významným epigenetickým faktorům, které regulují procesy v buněčných jádrech, tedy i v jádru.

Obrázek 2

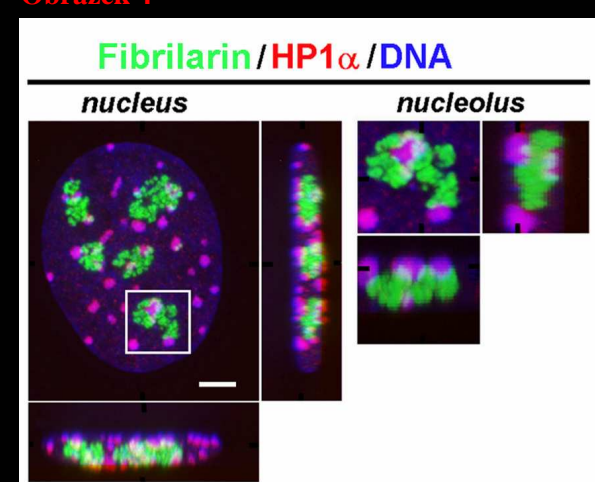


Obrázek 3

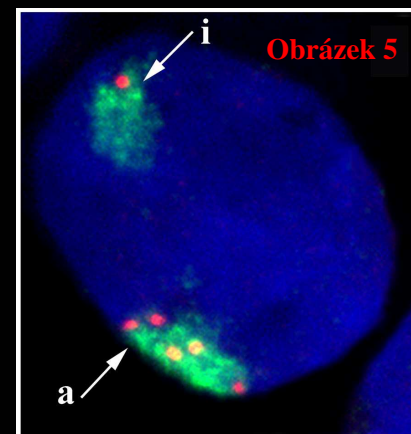


Výstupy z konfokálního mikroskopu jsou v naší laboratoři zpracovány pomocí speciálních softwarů, na jejichž vývoji spolupracujeme s kolegy z Fakulty informatiky, Masarykovy university v Brně, a nebo používáme některé komerčně dostupné programy. Na obrázku 3 je uvedená animace jaderek (červeně), centromerický heterochromatin (zelenomodré oblasti) HP1β protein (zeleně) a jaderná lamina (bleděmodře). Na obrázku 4 jsou vizualizována jádřka (zeleně) a klastry HP1α proteinu (fialově).

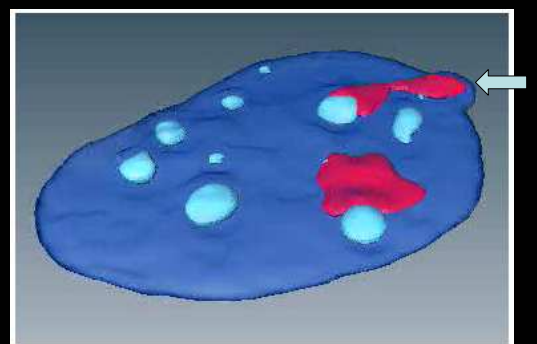
Obrázek 4



Naše laboratoř rovněž spolupracuje s klinickými pracovišti Lékařské fakulty Masarykovy university v Brně. Jsme zapojeni ve výzkumném projektu, který řeší problematiku cytogenetických a proteomických změn u nádorového onemocnění typu mnohočetného myelomu. Pro oddělení klinické cytogenetiky jsme připravili DNA sondy pro FISH techniku (například sonda pro úsek 1q21), která umožňuje stanovit cytogenetické změny v jádrech nádorových buněk. Na obrázku 5 je uvedena amplifikace protoonk genu c-myc (a, červené signály) u nádorových buněk. Zelená oblast je chromozomální teritorium. V normálních buňkách se geny vyskytují pouze v jedné kopii v každém ze dvou chromozomálních teritorií. Příklad teritoria chromozómu 8 s normální strukturou a karyotypem je uveden pod písmenem (i),



Obrázek 6



V laboratoři rovněž studujeme jak změny v expresi laminů, které se vyskytují na jaderné periferii (jaderná lamina), ovlivňují strukturu chromatinu. Tyto experimenty jsou aktuální především z hlediska poznání podstaty onemocnění zvaných laminopatie, ke kterým patří například svalová dystrofie. V případě těchto dědičných poruch bylo zjištěno, že buňky nejenom že nesyntetizují některé typy laminů, ale vyskytují se zde rozsáhlé změny v histonovém kódu. Navíc, v důsledku poškození laminů na jaderné periferii, dochází k deformaci buněk a vytvoření takzvaných jaderných vychlípenin (obrázek 6, šipka), které obsahují specifické typy chromatinu (červené oblasti) a naopak neobsahují některé proteiny jako například HP1α (zelené klastry).

Cílem naší práce je zjistit významné cytogenetické a proteomické změny, jejichž poznání by přispělo k objasnění podstaty některých závažných onemocnění.